

Наставно-научном већу
Технолошког факултета у Лесковцу

Одлуком Наставно-научног већа Технолошког факултета у Лесковцу, Универзитета у Нишу, број 4/92-XVIII од 21.09.2015. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану урађене докторске дисертације под називом „**ЕНЗИМСКА МОДИФИКАЦИЈА КВЕРЦЕТИНА СА ЦИСТЕИНОМ ПОМОЋУ ПЕРОКСИДАЗЕ ИЗ РЕНА**“, а коју је поднео кандидат Саша Савић, дипл. инг. технологије. На основу прегледа дисертације подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ
о оцени докторске дисертације

Кандидат Саша Савић је поднео докторску дисертацију са следећим садржајем: *Извод* (на српском и енглеском језику, по 2 стране), *Увод* (3 стране), *Теоријски део* (46 страна), *Експериментални део* (7 страна), *Резултати и дискусија* (41 страна), *Закључак* (3 стране), *Литература* (9 страна), *Биографија* (2 стране) и *Прилог* (37 страна).

У **Уводу** је указано на значај истраживања везаних за проблематику која обрађена је у докторској дисертацији. Истакнута је важност флавоноида и кверцетина као најважнијег и најпознатијег представника који се због својих корисних својстава препоручује за спречавање и сузбијање многих болести који су у блиској вези са оксидативним стресом. Поред тога, указано је на могућност стварања штетних семи- и орто-хинона до чијег стварања долази услед присуства оксидаза попут тирозиназе и пероксидазе. Формулисани су циљеви рада који се састоје у испитивању реакције модификације кверцетина са цистеином помоћу пероксидазе из рена. У оквиру ових испитивања укључено је одређивање кинетичког механизма реакције, затим развој нове *LC/MS* методе за идентификацију добијених производа у реакцији оксидације кверцетина у присуству пероксидазе из рена, као и имобилизација пероксидазе из рена на различитим хидрофобним носачима и карактеризација имобилисаног ензима. Осим тога, циљеви рада обухватају и оптимизацију реакције модификације кверцетина са имобилисаним ензимом и дефинисање оптималних услова за добијање нових модификованих производа кверцетина.

Теоријски део садржи основни преглед структура, механизме, улогу и поделу флавоноида. Дат је посебан осврт на значај кверцетина као главног представника флавоноида и описана активност пероксидазе из рена као и њен механизам оксидације флавоноида и

других фенолних једињења. Описане су методе за имобилизацију ензима и утицај имобилизације на својства имобилисаног ензима.

Експериментални део садржи детаљан опис извођења ензимских реакција и начина припреме полазних раствора једињења која су учествовала у реакцији модификације кверцетина. Кроз ово поглавље дати су описи *HPLC* и *UHPLC-DAD-HESI-MS/MS* метода које су коришћене за идентификацију насталих производа у реакцији модификације кверцетина са цистеином помоћу пероксидазе из рена. Поред тога, детаљно је описан поступак имобилизације ензима, одређивања кинетичког механизма, одређивања степена ациловања целулозних носача, одређивања активности пероксидазе из рена, као и поступак одређивања садржаја протеина.

Поглавље **Резултати и дискусија** садржи табеларни и графички приказ резултата докторске дисертације. Поглавље је презентовано кроз пет целина. У прва два поглавља су дати резултати оксидације кверцетина помоћу пероксидазе из рена најпре у одсуству, а затим и у присуству цистеина као нуклефилног агенса. Поред тога, у табелама су приказани називи идентификованих једињења која се стварају као производи у реакцијама оксидације, а касније и модификације кверцетина. У трећем делу испитиван је кинетички механизам реакције модификације кверцетина са цистеином помоћу пероксидазе из рена. Добијени резултати су приказани графички, при чему је највећи део полазних графика дат у прилогу. У четвртном и петом делу представљени су резултати оптимизације реакције модификације кверцетина када је коришћена неимобилисана, односно имобилисана пероксидаза из рена. У оквиру оптимизације поменуте реакције испитиван је утицај температуре, *pH* вредности, као и утицај концентрације кверцетина, цистеина и водоник пероксида.

У поглављу **Закључак** су сумирани и приказани најважнији резултати докторске дисертације:

- Идентификовани су производи оксидације кверцетина под дејством пероксидазе из рена. Међу идентификованим једињењима налазе се хинони кверцетина и његови деривати, флороглуцинол карбоксилна киселина, протокатехуинска киселина, хетеродимер кверцетина и његови деривати.
- Применом *UHPLC-DAD-HESI-MS/MS* методе у реакцији оксидације кверцетина помоћу пероксидазе из рена у присуству цистеина идентификована су два нова једињења која представљају цистеинил-кверцетинске адукте. Поред тога, доказано је да цистеин има способност да неутралише претходно створене оксидационе производе кверцетина.
- Утврђено је да се реакција модификације кверцетина са цистеином помоћу пероксидазе из рена одвија по усаглашеном кинетичком механизму: HRP најпре

реагује са водоник пероксидом и ствара активни интермедијерни облик HRP, који прво реагује са кверцетином, а затим и са цистеином, што на крају доводи до стварања 8- односно 6-цистеинил-кверцетинских адуката.

- Највећи принос модификованих производа у реакцији модификације кверцетина добијен је при температури од 35 °C, *pH* вредности од 6,8 и при 0,26 mM концентрацији водоник пероксида. У присуству 5% ДМСО у реакционој смеси могуће је добити око 9,5 пута већу количину цистеинил-кверцетинског адукта.
- Најуспешнија имобилизација преко хидрофобних интеракција је била на носачима типа бензоил целулозе, конкретно на носачима са ознаком *BC(III)* и *BC(V)*.
- Када је у реакцији модификације кверцетина коришћена имобилисана пероксидаза из рена, оптималне вредности су биле: 37 °C за температуру, *pH* вредност 7,0, а концентрације кверцетина, цистеина и водоник пероксида 0,14, 0,15 и 0,26 mM, респективно.

Кандидат је део резултата својих истраживања објавио у међународним часописима (два рада у међународном часопису), део резултата је саопштен на скуповима (два саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу) а поједини резултати су објављени у виду техничких и развојних решења (две нове метода).

На основу свега напред наведеног, Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације предлаже Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу да докторску дисертацију Саше Савића под називом „Ензимска модификација кверцетина са цистеином помоћу пероксидазе из рена“ прихвати као услов за стицање научног степена доктора наука и кандидата позове на усмену одбрану.

Комисија:

У Лесковцу,
06.10.2015.

др Андрија Шмелцеровић, ванредни професор, председник, с.р.
Медицински факултет, Ниш

Проф. др Живомир Петронијевић, редовни професор, ментор,
с.р.
Технолошки факултет, Лесковац

Проф. др Нада Николић, редовни професор, члан, с. р.
Технолошки факултет, Лесковац

СПИСАК РАДОВА КАНДИДАТА У КОЈИМА ЈЕ ОБЈАВЉЕН ДЕО РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рад у међународном часопису: $M_{23}=3$

1. С. Савић, Ж. Петронијевић, Kinetics of enzymatic modification of quercetin with L-cysteine by horseradish peroxidase. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 50 (2013) 221–226.
2. С. Савић, Ј. Станојевић, Д. Марковић, Ж. Петронијевић, Quercetin oxidation by horseradish peroxidase: The effect of UV-B irradiation. Chemical Industry, 67(3) (2013) 411–418.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу: $M_{64}=0,2$

1. Ж. Петронијевић, С. Савић, The kinetics of the enzymatic modification of quercetin with L-cysteine by using horseradish peroxidase, IX Симпозијум „Савремене технологије и привредни развој са међународним учешћем“, Зборник извода радова, стр. 47, Технолошки факултет, Лесковац, 21 и 22 октобар (2011).
2. С. Савић, Ж. Петронијевић, Kinetics mechanism of enzymatic modification of quercetin with cysteine by horseradish peroxidase, 22nd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstract, str. 100, Охрид, Македонија, 05-09 септембар (2012).

Нова метода: $M_{85}=2$

1. С. Савић, Ж. Петронијевић, ЛЦ-МС метода за идентификацију производа у реакцији кверцетина са пероксидазом из рена, Ев. бр. 06-2363/1, Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу, 20.12.2013.
2. С. Савић, Ж. Петронијевић, Метода за имобилизацију пероксидазе из рена на бензоил целулозним носачима, Ев. бр. 06-2364/1, Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу, 20.12.2013.

СПИСАК РАДОВА КАНДИДАТА КОЈИ СУ У ВЕЗИ СА ДИСЕРТАЦИЈОМ

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. С. Савић, К. Војиновић, С. Миленковић, А. Шмелцеровић, М. Lamshoeft, Ж. Петронијевић, Enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase: Kinetic mechanism and identification of a dimeric product by LC-Orbitrap mass spectrometry, Food Chemistry 141 (2013) 4194–4199.

Рад у међународном часопису (M23)

1. С. Петровић, С. Савић, Д. Марковић, Ж. Петронијевић, *In vitro* studies of temperature and pH influence on chlorophyll degradation by horseradish peroxidase: Spectroscopic and HPLC studies, Chemical industry, 68(2) (2014) 207–212.
2. С. Савић, С. Стојменовић, М. Петронијевић, Ж. Петронијевић, Phenol removal from aqueous solution by peroxidase extracted from horseradish, Applied Biochemistry and Microbiology, 50(2) (2014) 214–218.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

1. С. Савић, К. Војиновић, А. Шмелцеровић, Ж. Петронијевић, Kinetics mechanism of enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase, 15th European congress on biotechnology „Bio-crossroads“, New Biotechnology, 1.5.48, стр. 96, вол. 29, Истанбул, Турска, 23-26 септембар (2012).

Рад у часопису националног значаја (M52)

1. С. Савић, М. Николић, Ж. Петронијевић, Kinetic mechanism of enzymatic modification of rutin with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone by horseradish peroxidase, Advanced technologies, 2(1) (2012) 35–40.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

1. С. Петровић, С. Савић, Д. Марковић, Ж. Петронијевић, Деградација хлорофила а помоћу пероксидазе из рена: Идентификација производа и утицај температуре, X Симпозијум „Савремене технологије и привредни развој са међународним учешћем“, Зборник извода радова, стр. 99, Технолошки факултет, Лесковац, 22 и 23 октобар (2013).
2. С. Савић, К. Војиновић, А. Шмелцеровић, Ж. Петронијевић, Кинетика оксидације рутина помоћу пероксидазе из рена, X Симпозијум „Савремене технологије и привредни развој са међународним учешћем“, Зборник извода радова, стр. 57, Технолошки факултет, Лесковац, 22 и 23 октобар (2013).
3. С. Савић, С. Стојменовић, М. Петронијевић, Ж. Петронијевић, Уклањање фенола помоћу пероксидазе из рена, X Симпозијум „Савремене технологије и привредни развој са међународним учешћем“, Зборник извода радова, стр. 58, Технолошки факултет, Лесковац, 22 и 23 октобар (2013).

Нови технолошки поступак (M83)

1. С. Савић, С. Стојменовић, Ж. Петронијевић, Лабораторијски технолошки поступак за уклањање фенола из воденог раствора помоћу пероксидазе добијене екстракцијом из рена, Ев. бр. 06-2180/1, Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу, 27.12.2012.